



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Otorrinolaringologia

O papel do vírus Epstein-Barr no rastreio e deteção precoce do Carcinoma Nasofaríngeo

João Filipe Guerreiro Valadas da Silva

MAIO'2018



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Otorrinolaringologia

O papel do vírus Epstein-Barr no rastreio e deteção precoce do Carcinoma Nasofaríngeo

João Filipe Guerreiro Valadas da Silva

Orientado por:

Dr. Marco Alveirinho Simão

MAIO'2018

RESUMO

O vírus Epstein-Barr (EBV) é um herpesvírus que se encontra no organismo de quase toda a população mundial. Relaciona-se com diversas neoplasias, dentro das quais se salienta o carcinoma nasofaríngeo, constituindo um dos seus fatores de risco principais. Efetivamente, o seu ciclo de replicação tem um papel importante na carcinogénese (nomeadamente através dos genes e proteínas latentes do EBV) e na manutenção da infeção.

Elaborou-se, assim, uma revisão de um conjunto relevante de artigos com vista a melhor compreender o papel da fisiopatologia do carcinoma nasofaríngeo e bem assim a utilização de diversos marcadores relacionados com o EBV para rastreio e diagnóstico precoce da neoplasia, nomeadamente os anticorpos anti-EBV e o ADN do vírus, cuja facilidade de aplicação permite ultrapassar a dificuldade que resulta do uso de algumas técnicas na clínica como por exemplo a endoscopia tradicional ou a endoscopia de contacto.

Ainda assim, e apesar da sua reconhecida utilidade no rastreio de populações endémicas, alguns autores sugerem alternativas mais recentes com sensibilidade e especificidade superiores ao que até agora se tinha estudado, como é o caso dos autoanticorpos tumorais, de certas quimiocinas e dos miRNAs.

E se é verdade que se tem evoluído consideravelmente no conhecimento do rastreio e diagnóstico precoce do carcinoma nasofaríngeo, os resultados promissores dos novos artigos devem ser motivo de encorajamento no sentido de se desenvolverem estudos futuros mais aprofundados nesta neoplasia. O objetivo não deixa de ser o mesmo: a melhoria da qualidade de vida dos doentes, ao serviço da qual todos os esforços de investigação são obviamente de sublinhar.

Palavras-chave: carcinoma, nasofaríngeo, Epstein-Barr, rastreio, marcadores.

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML.

ABSTRACT

The Epstein-Barr virus (EBV) is a herpesvirus found in almost the entire world population. It is related to several tumors, namely the nasopharyngeal carcinoma, constituting one of its major risk factors. Indeed, its replication cycle plays an important role in carcinogenesis (notably through EBV latent genes and proteins) and in the maintenance of infection.

An article review was carried out in order to understand the role of the pathophysiology of nasopharyngeal carcinoma and the development of several EBV-related markers to screen and early diagnose the tumor, namely anti-EBV antibodies and virus DNA, whose ease of application allows to overcome some clinical techniques as traditional endoscopy or contact endoscopy.

Despite their renowned utility in the screening of endemic populations, some authors suggest newer alternatives with superior sensitivity and sensibility to what has hitherto been studied. These include tumor autoantibodies, certain chemokines and miRNAs.

Although there has been considerable progress in understanding the screening and early diagnosis of nasopharyngeal carcinoma, the promising results of the new articles should be encouraging in the further development of this tumor. The goal of giving patients the best quality of life is the same, which all research efforts are obviously worthy of note.

Key Words: carcinoma, nasopharyngeal, Epstein-Barr, screening, markers.

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML.

ÍNDICE

Introdução.....	6
1. Considerações gerais sobre a infecção por EBV e a fisiopatologia do carcinoma nasofaríngeo.....	8
A. A fase latente do ciclo de replicação do EBV.....	9
B. A função das proteínas latentes do EBV expressas no carcinoma nasofaríngeo....	10
C. A fase lítica do ciclo de replicação do EBV.....	12
D. Conclusão sobre a fisiopatologia do carcinoma nasofaríngeo e a implicação do EBV.....	12
2. Os marcadores do EBV no diagnóstico precoce do carcinoma nasofaríngeo.....	14
A. Os anticorpos anti-EBV na detecção precoce do carcinoma nasofaríngeo.....	16
B. O papel do ADN circulante do EBV no carcinoma nasofaríngeo.....	19
C. Algumas das perspectivas mais recentes relativas ao rastreio do carcinoma nasofaríngeo.....	21
Conclusão	25
Agradecimentos.....	26
Referências bibliográficas.....	27

INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, têm sido inúmeros os esforços efetuados com objetivo de identificar e explicar o carcinoma nasofaríngeo, considerado atualmente o tumor nasofaríngeo mais comum. Dignas de registo foram as investigações levadas a cabo nomeadamente por paleontologistas e por epidemiologistas, resultando no reconhecimento progressivo do carcinoma vindo de referir como entidade clínica e histológica [1,2].

Este carcinoma de células epiteliais pavimentosas apresenta uma epidemiologia muito característica particularmente pela sua incidência geográfica: frequente no sul da China e raro nas populações caucasianas, afeta mais os homens durante a idade adulta, sendo o pico de incidência, em termos de idade, entre os 40 e 60 anos [1,2].

Por outro lado, apresenta uma etiologia multifatorial que envolve, para além de componentes ambientais e genéticas, uma relação estreita com o vírus Epstein-Barr (EBV). Foi aliás comprovado que certos alimentos contendo nitrosaminas voláteis, o tabaco bem como, do ponto de vista genético, alguns antígenos leucocitários humanos (HLA) têm um papel preponderante no risco de desenvolvimento do carcinoma nasofaríngeo [1,2].

Não obstante, de todos os fatores acima mencionados, o EBV é portanto o objeto do presente trabalho não só porque este tem uma forte presença na população mundial (cerca de 95% é portadora crónica assintomática do vírus) mas também devido ao facto da infeção desempenhar um papel relevante nos mecanismos oncogénicos [3].

O estudo da relação entre o EBV e o carcinoma nasofaríngeo iniciou-se em 1966 com trabalhos de Old *et al.* que demonstraram a presença de anticorpos específicos no plasma de doentes com este carcinoma. Posteriormente, o papel do EBV foi continuamente aprofundado através de estudos que analisaram a relação do tumor com níveis elevados de anticorpos e IgA específicas contra o antígeno da cápside viral codificado pelo EBV, e bem assim a presença de DNA do vírus no carcinoma nasofaríngeo [3].

Em síntese e no essencial dir-se-á que esta revisão visa aprofundar o entendimento de como o EBV favoreceu a emergência de “armas” para o rastreio desta entidade. Do mesmo passo, aproveita-se para dar conta do estado atual do conhecimento bem como identificar as perspectivas futuras e as limitações no despertar de novas descobertas.

Para a realização deste trabalho, foram consultados diversos artigos publicados entre 1976 e 2018, que se encontram citados nas referências bibliográficas. Na pesquisa efetuada, recorreu-se a diferentes motores de busca tais como Medscape, PubMed e UptoDate, utilizando vários termos, nomeadamente: *NPC*, *EBV infection*, *NPC screening*, *NPC and EBV*, *Nasopharyngeal Carcinoma*, *Epstein-Barr virus and Nasopharyngeal Carcinoma* e *EBV DNA*. Por outro lado, e para além dos artigos acima mencionados, foram também consultadas várias publicações que se encontram identificadas nas referências bibliográficas e, bem assim, foram consultados alguns sítios *internet*.

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A INFECÇÃO POR EBV E A FISIOPATOLOGIA DO CARCINOMA NASOFARÍNGEO

As infecções parecem estar envolvidas no desenvolvimento de aproximadamente 20% dos cânceros no ser humano e os estudos desenvolvem um contínuo trabalho no sentido de iluminar o papel das mesmas nos mecanismos oncogénicos. O EBV foi o primeiro vírus humano tumoral a ser descoberto, o que contribuiu para efetuar um estudo aprofundado da patogénese de diversas neoplasias e da infeção persistente do EBV [3].

O estudo da implicação do EBV na fisiopatologia do carcinoma nasofaríngeo foi em muito conseguido através de biópsias do carcinoma. Estas contribuíram não só para uma maior compreensão da patogénese do EBV, como ajudaram a esclarecer o estado da infeção e a sua expressão genética viral [4].

O EBV é um herpesvírus humano que se transmite essencialmente pela saliva e que se caracteriza pela sua persistência no organismo de praticamente todos os humanos a nível mundial [5].

Os estudos que se debruçam sobre a mononucleose infecciosa [6,7] mostram que a infeção primária, ou seja, a primeira vez a que se é exposto e infetado por um dado patogénio, está particularmente associada ao desenvolvimento socioeconómico da população. Efetivamente, verifica-se que nos países economicamente mais desfavorecidos a infeção primária do EBV ocorre em fases mais precoces da vida, não desenvolvendo quaisquer sintomas na maioria das pessoas afetadas. Contrariamente, nos países desenvolvidos a infeção tem tendência a ocorrer nas pessoas mais idosas, muitas vezes sob a forma de mononucleose infecciosa, caracterizando-se por odinofagia, febre, linfadenopatias cervicais e fadiga [1,6].

O EBV infeta primariamente a orofaringe do hospedeiro e aí interage com os linfócitos B. As células epiteliais e os linfócitos T são outros tipos de células que podem também ser alvos do vírus, ainda que aqui com menos eficácia. A infeção viral e a sua persistência foram explicadas pelo modelo do centro germinal [8], que é ilustrado na figura 1.

Juntamente com a compreensão que se tem da interação entre o sistema imune do hospedeiro e o vírus, o modelo do centro germinal explica as duas fases do ciclo de replicação do EBV: a fase latente e a fase lítica [9].

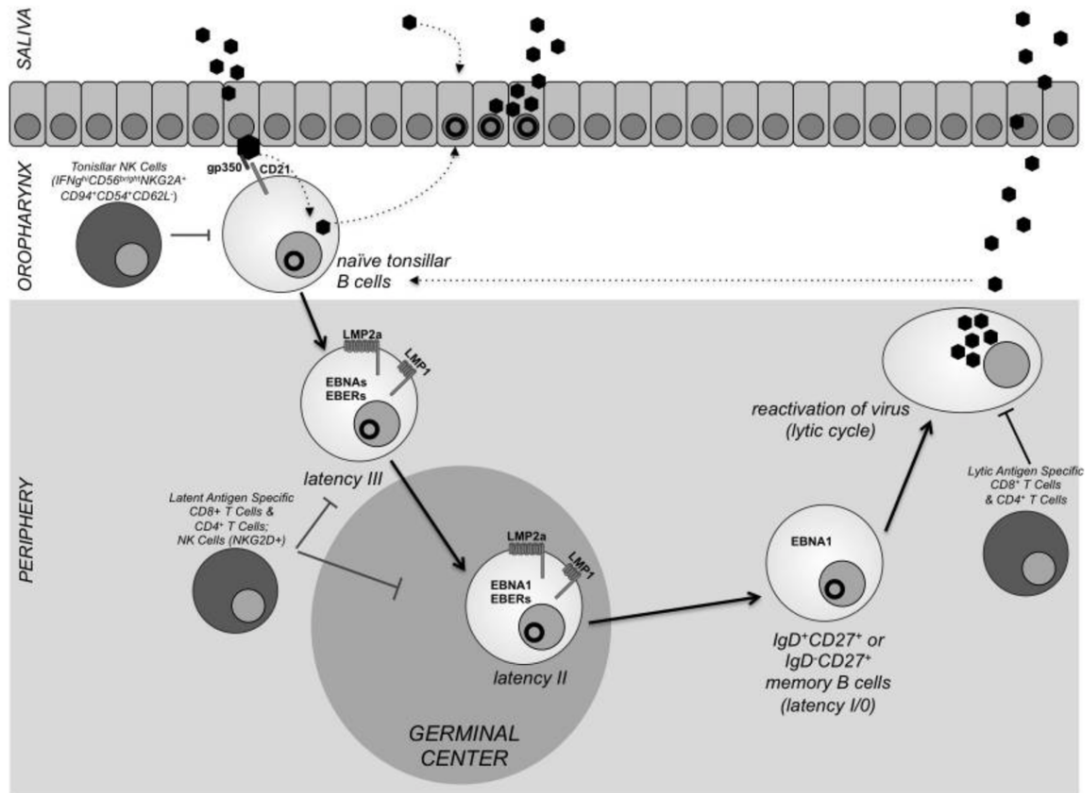


Figura 1. Modelo do centro germinal e as interações com o sistema imune do hospedeiro. In Hatton OL, Arnold-Harris A, Schaffert S, Krams SM, Martinez OM. *The Interplay Between Epstein Barr Virus and B Lymphocytes: Implications for Infection, Immunity, and Disease. Immunologic research.* 2014;58(0):268-276.

A. A fase latente do ciclo de replicação do EBV

Nos momentos iniciais da fase latente, o EBV liga-se aos linfócitos B naïves. Estes são então ativados e proliferam de forma latente ao nível dos tecidos periféricos. Além de conter várias cópias de DNA viral circular e extracromossomal, as novas linhas celulares que resultaram da ativação dos linfócitos expressam também diversas proteínas latentes. Estas são essencialmente de três grandes classes: antígenos nucleares (EBNAs 1, 2, 3A,

3B, 3C e LP), proteínas de membrana latentes (LMPs 1, 2A e 2B) e moléculas de RNA (EBER1 e EBER2). Por outro lado, transcritos da região BamHI-A (Bam A) do genoma viral, nomeadamente miRNAs, são também encontrados nas novas linhas celulares [3]. Nesta fase, o vírus encontra-se num estado de latência do tipo III.

De seguida, as células B infetadas dirigem-se ao centro germinal dos nódulos linfáticos, onde o vírus estabelece o seu estado de latência do tipo II (aqui, estão expressas as moléculas de RNA, os genes que codificam EBNA1, LMP1 e LMP2, e transcritos da região BamHI-A [4]). Nesta fase, as células infetadas diferenciam-se em células B de memória, que posteriormente saem dos centros germinais. O EBV permanece então nessas células de memória, onde estabelece o seu estado de latência do tipo I se houver expressão de EBNA1 durante a divisão celular. O EBNA1 é particularmente responsável pela manutenção da infeção já que permite a replicação e a segregação da genoma viral para que este fique retido na célula [10].

Assim, nesta fase, o vírus, capaz de alterar a capacidade de crescimento dos linfócitos B, é replicado pela DNA polimerase do hospedeiro [4].

B. A função das proteínas latentes do EBV expressas no carcinoma nasofaríngeo

Para além de se analisarem os mecanismos da fase latente do ciclo de replicação do EBV, importa também abordar as proteínas do EBV que aparecem nesta mesma fase e estudar as suas funções, já que a sua compreensão é muito importante na determinação do papel da infeção viral na carcinogénese [3].

De um modo geral, as proteínas impedem as células de entrarem em apoptose ao interferirem com diversas vias oncogénicas e vias de sinalização.

Por exemplo, a proteína EBNA1 permite a destabilização do p53. Já a proteína LMP1, além de ter um papel na inibição da apoptose, é importante para a transformação das células B *in vitro*. Contribui para a adesão celular e estimulação de diversas citocinas pró-inflamatórias [3].

Outras proteínas, como a LMP2 estão também envolvidas na oncogénese pela inibição da diferenciação celular e outros mecanismos anteriormente explicados. Existe,

no entanto, uma característica muito própria da LMP2: a sua capacidade de induzir a transição epitélio-mesênquima, um processo essencial à metastização. Já as proteínas EBERs 1 e 2 são capazes de induzir o fator de crescimento insulina-like (IGF1) nas linhas celulares de carcinoma nasofaríngeo, associando-se a aumento de crescimento destas últimas [3].

Anote-se por outro lado que outras moléculas de RNA codificadas pela região BamHI-A do genoma viral foram identificadas numa fase inicial no carcinoma nasofaríngeo. Estes registos denominados miRNAs BARTs (*BamHI-A rightward transcripts*), parecem constituir uma proteção contra a apoptose. Um outro registo da região BamHI-A é o BARF1, que codifica uma proteína expressa na fase latente presente no carcinoma nasofaríngeo associado a EBV, sendo que vários estudos demonstraram que apresentava atividade oncogénica quando expresso em fibroblastos de roedores e células epiteliais de símios [3]. Mas não é só a partir da região BamHI-A que se originam proteínas relacionadas com o EBV. Com efeito, outras regiões repetidas de genoma viral são observadas em diferentes tipos de EBV. Por exemplo, a região BamHI-WYH codifica a EBNA2 [3].

Assim, o estudo dos genes e proteínas da fase latente é da maior importância por se verificar que são decisivos no desenvolvimento do carcinoma nasofaríngeo. Efetivamente apresentam características necessárias à carcinogénese, sendo que mesmo algumas delas foram estudadas como possíveis marcadores diagnósticos do carcinoma nasofaríngeo como se verá adiante.

C. A fase lítica do ciclo de replicação do EBV

O EBV aproveita as diferentes fases do desenvolvimento das células B para estabelecer uma infeção latente vitalícia no organismo humano. No entanto, o vírus pode sair desse período de latência quando o genoma viral é ativado: o EBV entra então na sua fase lítica [1]. Foi demonstrado que as reativações do vírus acontecem ao nível das células B e células epiteliais, mas os seus fatores desencadeantes ainda não são totalmente conhecidos. A fase lítica culminará na produção de viriões (que contêm DNA), o que não acontece na fase latente [11].

Aquando da reativação, o EBV passa por três fases líticas distintas: a fase imediata, precoce e tardia, durante as quais são codificadas várias proteínas virais [12]. Os genes da fase imediata – BZLF1 e BRLF2 – começam por codificar dois transativadores: Zta e Rta respetivamente, processo que é seguido pela expressão de genes da fase precoce importantes para a replicação do genoma viral.

Após a replicação do DNA, os genes da fase tardia codificam proteínas virais estruturais, nomeadamente o antigénio da cápside viral (VCA) e proteínas do antigénio de membrana tardio (EA). O ciclo culmina com a produção de viriões maduros [5,12].

Ambas as fases da replicação do EBV são importantes no processo de carcinogénese, sendo que durante a fase lítica são produzidas várias citocinas bem como fatores de crescimento tumoral que permitem o desenvolvimento de patologia neoplásica.

D. Conclusão sobre a fisiopatologia do carcinoma nasofaríngeo e a implicação do EBV

A instalação do carcinoma nasofaríngeo começa quando um indivíduo predisposto é exposto a certos fatores ambientais (os fatores de risco acima vistos: alimentos com nitrosaminas voláteis...). Há então perda de heterozigotia e concomitantemente instalam-se lesões de baixo grau, que sofrem alterações genéticas e epigenéticas tornando-se suscetíveis à infeção pelo EBV, a qual potencia um ambiente ainda mais favorável à progressão da carcinogénese, nomeadamente graças à presença de genes e proteínas latentes que efetivamente apresentam propriedades oncogénicas (inibição da apoptose, crescimento celular...) [3].

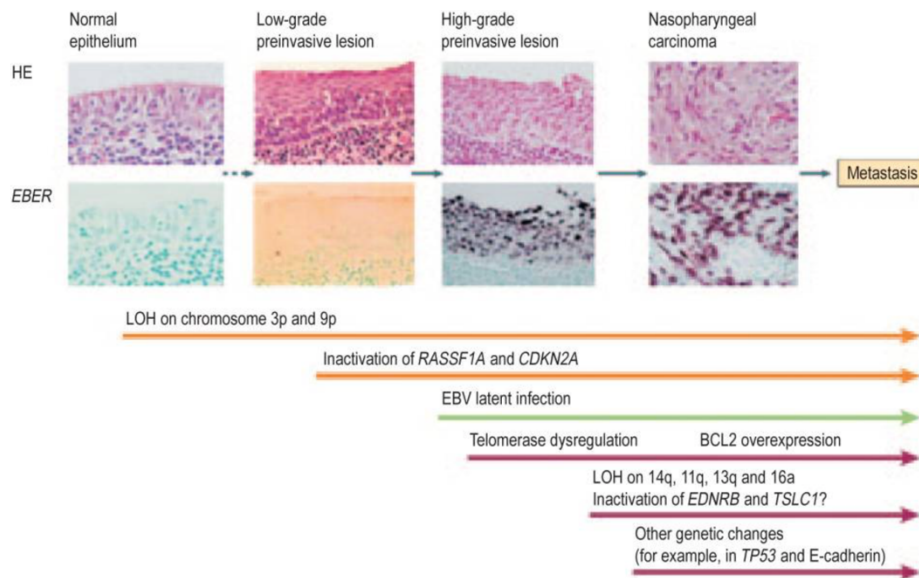


Figura 2. Os eventos fisiopatológicos do carcinoma nasofaríngeo. In Young L. S., and Dawson C. W.. 2014. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. Chin. J. Cancer 33:581–590.

2. OS MARCADORES DO EBV NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DO CARCINOMA NASOFARÍNGEO

Como em muitas outras neoplasias, o fator de prognóstico mais importante do carcinoma nasofaríngeo é a extensão da doença na sua apresentação. De facto, verificou-se que os doentes que se apresentam com doença localizada têm uma sobrevida de 90% aos 5 anos enquanto nos que têm doença locorregional avançada com metástases a taxa de sobrevida é de 50% aos 5 anos. Verificou-se igualmente que doentes com doença mais avançada apresentam mais morbilidades associadas aos tratamentos que efetuam. Concluiu-se assim que o rastreio da doença em estados mais precoces constitui uma vantagem, nomeadamente em doentes assintomáticos e nas áreas endémicas [13].

O objetivo do rastreio é permitir um diagnóstico precoce da neoplasia para que o tratamento seja instituído o mais rapidamente possível, aumentando assim a probabilidade de cura do doente e diminuindo a sua morbi-mortalidade. E isto justifica a instauração de um programa de rastreio. Para que um teste de rastreio possa ser usado, este tem que cumprir vários requisitos. Deve ser facilmente aplicável e ter em linha de conta quatro parâmetros essenciais: a especificidade, a sensibilidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo [1]. E são de facto estes os parâmetros que se utilizaram quando se estudaram os marcadores do EBV no rastreio do carcinoma nasofaríngeo, salientando-se, mais uma vez, a importância da compreensão das características do vírus no progresso registado e no trabalho positivo que tem vindo a ser desenvolvido.

Antes de referir os marcadores intrinsecamente relacionados com o EBV, é importante falar da relação da clínica com o rastreio e a deteção precoce do carcinoma nasofaríngeo. A clínica constitui um passo importante no diagnóstico do carcinoma, uma vez que é uma das primeiras linhas de abordagem ao doente.

Assim, para o diagnóstico precoce do carcinoma nasofaríngeo é importante reconhecer os sintomas iniciais da doença. Neste caso, a sua deteção pode ser difícil uma vez que a sintomatologia pode não estar necessariamente relacionada com o sítio primário do tumor, neste caso a nasofaringe. Efetivamente, o carcinoma nasofaríngeo possui grande capacidade de metastização, o que pode justificar a sintomatologia inicial. Alguns dos sintomas a ter em conta são a rinorreia e saliva sanguinolentas, zumbido e os nódulos

cervicais indolores (estes últimos muito relacionados com a disseminação linfática precoce que muitas vezes se verifica no carcinoma nasofaríngeo) [14].

O exame da nasofaringe desempenha também um papel essencial na clínica. Nesse sentido, a faringoscopia é um dos métodos mais usados para observar a nasofaringe, mas está muito dependente do doente e nem sempre é fácil efetuá-la. Neste exame, é possível observar anomalias estruturais e fazer biópsia para exame histológico [14].

No entanto, nos últimos anos, tem-se imposto um método que parece ser muito eficaz na identificação do carcinoma nasofaríngeo: a endoscopia de contacto. Efetivamente, verificou-se que este tumor, quando recidiva, tende a crescer na submucosa, fazendo com que a acuidade diagnóstica através da biópsia por endoscopia seja inferior a 50%. Assim, teve que recorrer-se a um método mais adequado para identificar patologia menos passiva de ser descoberta. Assim, a endoscopia de contacto permite diferenciar o epitélio normal de maligno em muitos casos e aparece como um método complementar à endoscopia tradicional quando esta não obtém resultados conclusivos [15].

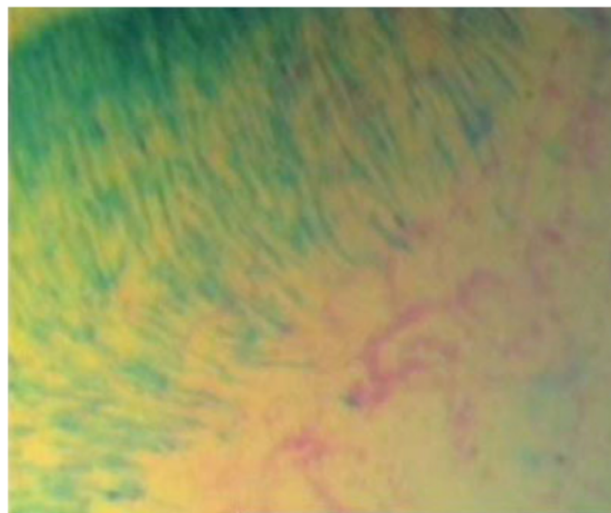


Figura 3. Endoscopia de contacto – Nasofaringe normal (epitélio ciliado pseudoestratificado). In Pak MW, Vlantis AC, Chow S, van Hasselt CA. How reliable is contact endoscopy of the nasopharynx in patients with nasopharyngeal cancer? The Laryngoscope 2009; 119:523–7.



Figura 4. Endoscopia de contacto – Carcinoma nasofaríngeo primário ou recorrente. Observam-se células com núcleos de grandes dimensões e pleiomórficos. In Pak MW, Vlantis AC, Chow S, van Hasselt CA. How reliable is contact endoscopy of the nasopharynx in patients with nasopharyngeal cancer? The Laryngoscope 2009; 119:523–7.

Verifica-se que a faringoscopia e a biópsia são exames invasivos, não se recomendando a sua utilização no rastreio [14]. Apesar de a endoscopia de contacto ter a sua utilidade na doença precoce e recorrente [15], outros métodos são usados no rastreio pela sua facilidade de execução, nomeadamente os biomarcadores relacionados ao EBV.

A. Os anticorpos anti-EBV na deteção precoce do carcinoma nasofaríngeo

Durante e depois da infeção por EBV, vários anticorpos contra os produtos do vírus podem ser produzidos pelo organismo, como é o caso das EA-IgA, EA-IgG e VCA-IgA, e podem ser usados para o diagnóstico precoce e rastreio do carcinoma nasofaríngeo [16,17].

Inicialmente, os estudos de rastreio incidiram nas populações de alto risco, verificando-se a existência de concentrações elevadas de EA-IgA, VCA-IgA e anti-EBV DNase nos doentes com carcinoma nasofaríngeo [16, 18, 19]. Por outro lado, vários

outros estudos admitiram a possibilidade da produção elevada de anticorpos já estar presente numa fase precoce do carcinoma nasofaríngeo (estádio de carcinoma *in situ*) [20], pelo que formularam desde logo a hipótese de o nível elevado destes anticorpos poder preceder o diagnóstico de carcinoma nasofaríngeo num período de tempo extenso [20] e, assim, serem potenciais marcadores preditivos deste diagnóstico.

A verdade é que muitos destes estudos iniciais utilizaram resultados serológicos com base em amostras de sangue de doentes a quem já tinha sido diagnosticado carcinoma nasofaríngeo, impedindo assim correlacionar com clareza a replicação do EBV com a ocorrência da neoplasia [21].

Aliás, um estudo levado a cabo por Yin-Chu Chen et al. [22] contribuiu para corroborar a hipótese de que os anticorpos podiam efetivamente servir de marcadores precoces de diagnóstico. Este último demonstrou o aparecimento de anticorpos anti-DNase e VCA-IgA muito antes do desenvolvimento do carcinoma nasofaríngeo, sublinhando a vantagem de as amostras de sangue terem sido colhidas antes do diagnóstico de carcinoma nasofaríngeo ter sido feito, ultrapassando a incógnita que na altura ainda se mantinha. Na mesma linha de investigação, um outro estudo [20] focou-se na avaliação clínica e serológica de vários doentes ao longo de períodos de tempo longos antes do diagnóstico de carcinoma nasofaríngeo ser feito. Neste último caso, verificou-se a existência de um período designado como “janela” e caracterizado pela elevação dos anticorpos anti-EBV. Ao demonstrar que a maioria dos doentes entrava neste período antes de se tornar sintomático, essa “janela” permitiu numa fase pré-clínica estabelecer os anticorpos como um marcador precoce de carcinoma nasofaríngeo [20].

Importa ainda assinalar que diversos estudos se debruçaram sobre os anticorpos anti-EBV, fundamentalmente com o objetivo de verificar o valor da sua acuidade diagnóstica. Neste quadro, referem-se apenas alguns dos muitos trabalhos marcantes na avaliação desse aspeto, como por exemplo o trabalho de Tsang RK et al. que concentraram o seu esforço na investigação da sensibilidade e especificidade das concentrações de IgA do EBV no diagnóstico de carcinoma nasofaríngeo [23], permitindo-lhes verificar que relativamente aos títulos de VCA-IgA, a sensibilidade para diagnosticar a neoplasia era de 89% e a especificidade de 80%. Para o EA-IgA, a sensibilidade e a especificidade foram de 63% e 97% respetivamente. Concluíram afinal que apesar do VCA-IgA ser sensível para o diagnóstico do carcinoma nasofaríngeo, o

mesmo não deveria ser utilizado como único meio para o seu rastreio em zonas endêmicas (até porque o EA-IgA revelou ser mais específico). Já Chen Y et al. realizaram uma meta-análise baseada em 21 estudos diferentes de forma a avaliar o valor diagnóstico do VCA-IgA no carcinoma nasofaríngeo [24], tendo concluído que os níveis VCA-IgA tinham elevada especificidade e sensibilidade no diagnóstico de carcinoma nasofaríngeo, especialmente quando se usava um teste imunoenzimático. No entanto, a medição dos níveis desse anticorpo revelou ter uma acuidade inferior quando comparada com a combinação de múltiplos antígenos do EBV [24].

Por outro lado, Xia C et al. (2015) analisaram o valor diagnóstico de Rta-IgG, EA-IgA e VCA-IgA, corroborando as conclusões dos estudos anteriores. Efetivamente, vieram demonstrar que, apesar do VCA-IgA ter a maior sensibilidade e o EA-IgA a maior especificidade, era a combinação dos diferentes marcadores supracitados no plasma que conferia os melhores resultados, evitando fazer o diagnóstico errado [25]. De resto, alguns dos estudos levados a cabo no sul da China concluíram que o método de deteção por ELISA era melhor que o teste por imunofluorescência no rastreio de grande escala do carcinoma nasofaríngeo, porquanto verificaram que o VCA-IgA e o EBNA1-IgA tinham bons resultados com o ELISA, recomendando esta combinação para o rastreio do carcinoma nasofaríngeo em massa [26].

Em suma, considerando o EBV como um marco precoce na fisiopatologia do carcinoma nasofaríngeo e o aparecimento de concentrações elevadas de anticorpos anti-EBV muitos anos antes de se objetivarem manifestações clínicas relacionadas com o tumor, vários estudos demonstraram a utilidade do recurso aos anticorpos no rastreio do carcinoma nasofaríngeo.

Acrescente-se que na maioria dos ensaios clínicos iniciais foi estudado o comportamento do VCA-IgA e EA-IgA, mas mais recentemente implicou-se também o papel do EBNA1-IgA [27], tendo-se constatado que os marcadores serológicos, quando usados conjuntamente, têm uma acuidade diagnóstica superior ao seu uso individual. É claro que para o aumento da acuidade diagnóstica também contribuíram alguns métodos usados, nomeadamente o ELISA que provou ser superior.

No entanto, e apesar do uso dos anticorpos no rastreio ser geralmente aceite, existem alguns inconvenientes à sua aplicação em populações onde o tumor conhece uma

elevada incidência. Uma das razões prende-se com o facto de apenas 2% das pessoas com títulos elevados de VCA-IgA nas regiões de alto risco desenvolver carcinoma nasofaríngeo. Por outro lado, a evidência serológica de que o EBV reativou, conforme indicado pela alta concentração de anticorpos contra antígenos da fase lítica, também é encontrada em indivíduos normais, o que contribui para a diminuição da sua especificidade [27].

Foram de resto estas limitações que acabaram por orientar o interesse de diversos investigadores para outras áreas, nomeadamente para o ADN do EBV, e que paralelamente foi-se impondo como um possível teste alternativo também passível de ser usado para o rastreio do carcinoma nasofaríngeo.

B. O papel do ADN circulante do EBV no carcinoma nasofaríngeo

No final do século XX, o ADN circulante do EBV começa a ser investigado como um possível biomarcador para a deteção do carcinoma nasofaríngeo [29]. Este ADN é composto por vários fragmentos libertados por células cancerígenas durante a apoptose. Com o uso de PCR convencional, verificou-se que o ADN plasmático estava em 31% dos doentes com carcinoma nasofaríngeo [28, 29].

Num outro estudo, detetou-se o ADN do vírus em 75% dos doentes. Notou-se desde logo uma grande variedade na taxa de deteção do ADN, que se pode relacionar com o facto da PCR e outros testes de eletroforese serem somente qualitativos [14]. Já a investigação de Lo et al. permitiu registar importantes progressos em 1999, usando PCR em tempo real e, comprovando a presença de ADN viral em 96% dos doentes.

Estes investigadores demonstraram ainda que após 1 mês de radioterapia, os níveis de ADN permaneciam indetetáveis em 47% dos doentes. Assim, sugeriu-se que as concentrações de ADN viral circulante podiam refletir a carga neoplásica dos doentes e que a sua análise quantitativa podia ser útil no rastreio e monitorização dos doentes com carcinoma nasofaríngeo [14].

Deste modo, numa população de risco, a deteção de ADN viral pode ser um método simples de ser reproduzido e eficaz. Note-se que um dos aspetos que faz com que

o ADN seja um marcador tão eficaz prende-se com as suas próprias características estruturais. De facto, sendo constituído por sequências repetitivas de *Bam*HI W e alta concentração no plasma, constitui um método sensível para ser usado em PCR e para permitir o rastreio de grandes populações. Desta forma, a sequência repetitiva do fragmento *Bam*HI W é um alvo ideal para aplicar PCR [30].

Então, muitos estudos começaram a avaliar o potencial do ADN viral como um método de rastreio do carcinoma nasofaríngeo em populações endémicas. Por exemplo, Chan et al. interessaram-se por verificar a hipótese de o ADN do EBV poder ser um bom método para detetar precocemente carcinoma nasofaríngeo num estágio ainda assintomático [29]. Para tal, seguiram durante 2 anos 1318 doentes assintomáticos que tinham ADN viral detetável no plasma ou serologia positiva para IgA com o objetivo de avaliar o desenvolvimento do carcinoma nasofaríngeo.

Efetivamente, o grupo demonstrou que o ADN do EBV plasmático era um método sensível para detetar carcinoma nasofaríngeo precoce e assintomático: em três doentes a quem identificaram carcinoma nasofaríngeo, dois não apresentavam sintomas. Demonstraram ainda que a análise do ADN parecia ser mais sensível que a do VCA-IgA na deteção de tumor em estágio precoce, o que também confirma os resultados de muitos outros estudos [31,32]. Além disso, constataram igualmente que a adição de um teste serológico não aumentaria a sensibilidade do rastreio da neoplasia, uma vez que dos 3 doentes que tinham ADN positivo no plasma, apenas 1 tinha o VCA-IgA positivo. Este resultado confirma os de outros estudos que demonstraram que o VCA-IgA era menos sensível que o ADN do EBV na deteção de carcinoma nasofaríngeo precoce, embora já com confirmação diagnóstica clínica [33].

Um outro estudo, que decorreu entre 2013 e 2016 liderado pelo Dr. Lo em Hong Kong, voltou a salientar que o ADN do EBV é altamente específico (98,6%) e sensível (97,1%) para detetar carcinoma nasofaríngeo em homens assintomáticos de alto risco, tendo a maioria dos doentes sido detetados em estádios mais precoces [30].

As mesmas conclusões têm vindo a obter-se em estudos mais recentes confirmando que de facto o ADN é uma boa alternativa aos anticorpos tradicionais anti-EBV, até em testes em que estes são usados em combinação, podendo servir em doentes que inicialmente tenham um rastreio negativo feito com base em testes serológicos

(anticorpos) ou que sejam assintomáticos, mas que possam vir a desenvolver carcinoma nasofaríngeo num prazo relativamente curto, por exemplo, de 2 anos [30]. Por outro lado, verificou-se também que a escolha do ADN viral como método complementar ao VCA-IgA, este último usado como primeiro passo num protocolo de rastreio, podia aumentar a especificidade inicial do anticorpo com uma relação custo/benefício bastante razoável [34].

Assim, não se pode deixar de salientar o impacto positivo que o teste de rastreio quantitativo de deteção de ADN viral pode ter na deteção de populações em risco, sendo, por isso, importante incentivar esta prática [30].

Refira-se, por outro lado, que alguns estudos evidenciaram também o papel específico que as oncoproteínas associadas ao genes latentes do EBV podem desempenhar na identificação precoce do carcinoma nasofaríngeo [35], nomeadamente o LMP1 e o BARF1, este último é, aliás, relativamente promissor uma vez que é susceptível de ser aplicado a doentes de todas as idades.

C. Algumas das perspetivas mais recentes relativas ao rastreio do carcinoma nasofaríngeo

Mais recentemente, alguns autores têm vindo a apontar limitações relacionadas com os marcadores usados no rastreio do carcinoma nasofaríngeo. Efetivamente, e como já se disse, o VCA-IgA apresenta uma boa sensibilidade, mas a taxa de falsos-positivos é alta e a sua especificidade não é a mais apropriada. Daí que, alguns dos novos estudos nesta matéria venham alertar para a necessidade de arranjar novos biomarcadores que possam identificar o tumor em doentes com VCA-IgA positivo.

A este propósito, um novo estudo de Min-Jie et al. propôs a quimiocina CCL27 como um possível marcador para essa população, tendo sido, aliás, pioneiro nesta avaliação [36]. As quimiocinas são pequenas proteínas com um papel importante no sistema imune, nomeadamente no que se refere ao desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos T. De acordo com Min-Jie et al., vários estudos demonstraram que as quimiocinas tinham um papel importante na regulação do crescimento de tumores, nomeadamente na proliferação e metastização, reconhecendo embora, que a importância

da CCL27 no carcinoma nasofaríngeo ainda era incerta, e obrigando a medir as concentrações plasmáticas de CCL27 em doentes com carcinoma nasofaríngeo, em doentes saudáveis com VCA-IgA positivo e em dadores saudáveis com VCA-IgA negativo.

Concluíram, então, que as concentrações plasmáticas de CCL27 podiam efetivamente diferenciar os doentes com carcinoma nasofaríngeo estabelecido dos dadores saudáveis VCA-IgA positivo com uma sensibilidade e especificidade de 67% e 73,10% respetivamente. Para além disso, verificaram também que esta quimiocina podia distinguir doentes com carcinoma nasofaríngeo em estágio precoce de dadores saudáveis VCA-IgA positivo. Na verdade, o CCL27 poderia servir como um biomarcador para identificar os doentes com carcinoma nasofaríngeo e como um complemento ao VCA-IgA, com a vantagem adicional, como salientaram, de a quimiocina em questão ser detetável com facilidade. Referiram ainda que o CCL27 poderia combinar-se aos marcadores virais tradicionais (VCA-IgA e EA-IgA) com o intuito de se constituir um método mais eficaz na deteção de carcinoma nasofaríngeo [36].

Outras perspetivas mais recentes têm orientado o foco do seu interesse para o papel que os autoanticorpos podem ter na deteção do carcinoma nasofaríngeo. Com efeito, têm vindo a ser descritos autoanticorpos contra os antigénios tumorais nas amostras de sangue de diversos doentes oncológicos. Estes autoanticorpos parecem aparecer meses a anos antes do diagnóstico clínico do tumor, o que faria da sua medição um bom marcador para diagnóstico de neoplasia em estádios precoces [37].

Vários estudos demonstraram já que a utilização de painéis específicos de autoanticorpos poderia resolver as lacunas apresentadas pelo VCA-IgA na deteção dos doentes com carcinoma nasofaríngeo VCA-IgA negativo. Deste modo, juntamente com os marcadores do EBV tradicionais, poderiam constituir uma ajuda na deteção precoce da neoplasia [37]. Exemplos específicos surgem nos estudos sobre autoanticorpos contra NY-ESO-1, PRDX2 e PRDX3 [38, 39].

O NY-ESO é um dos antigénios tumorais mais imunogénicos. Os anticorpos induzidos por estes encontram-se numa diversidade de neoplasias, nomeadamente próstata, pulmão e mama, possibilitando uma deteção precoce dos mesmos. O estudo da concentração plasmática dos autoanticorpos contra NY-ESO-1 nos doentes com

carcinoma nasofaríngeo permitiu então verificar que este autoanticorpo poderia servir como um marcador para o diagnóstico precoce de carcinoma nasofaríngeo, especialmente quando associado com VCA-IgA (com sensibilidade e uma especificidade modesta) [38].

Adicionalmente foram também estudados outros antígenos associados a cancro: o PRDX2 e o PRDX3 [39]. Os autoanticorpos por eles induzidos mostraram ser um potencial suplemento ao VCA-IgA., demonstrando uma sensibilidade diagnóstica superior ao uso do VCA-IgA por si só.

Apesar dos resultados promissores que se fizeram com os autoanticorpos, uma das grandes limitações destes estudos consistiu no acompanhamento de um número reduzido de doentes com doença precoce, havendo pois necessidade de recorrer a estudos de coorte com amostras bem maiores e mais representativas [38, 39].

Refira-se ainda que alguns autores têm vindo a salientar importância que os miRNAs podem ter enquanto marcadores diagnósticos do carcinoma nasofaríngeo [40,41], não obstante a falta de estudos validados para alvos de miRNAs e, pese embora, os avanços que se constatarem (descritos nos últimos parágrafos) e os resultados dos estudos que se fizeram relativamente ao DNA do EBV. No entanto, devido à sua estabilidade no plasma, os miRNAs têm efetivamente sido reconhecidos como possíveis biomarcadores tumorais, e foi demonstrado que os miRNAs BART podem ter um papel importante na deteção e prognóstico do carcinoma nasofaríngeo [3].

Um estudo denominado: “Profiling of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs in nasopharyngeal carcinoma reveals potential biomarkers and oncomirs” propõe assim os miRNAs como um possível biomarcador de diagnóstico de carcinoma nasofaríngeo. Verificam que os miRNAs do EBV aparecem em número comparável (até mesmo mais elevado) ao DNA viral em condições de rastreio.

Com a identificação de miRNAs do EBV mais exclusivos no carcinoma nasofaríngeo, estes estudos propõem até possíveis rastreios para outras neoplasias associadas ao EBV com níveis elevados de DNA viral circulante, e implicam os miRNAs BART na carcinogénese do carcinoma nasofaríngeo pelo seu envolvimento em vias de crescimento tumoral, e também na génese de metástases. Sublinham, no entanto, que é preciso concentrar mais esforços no sentido de estudar os miRNAs enquanto arma no rastreio desta neoplasia [40].

Um outro estudo focou-se num miRNA específico, transcrito da região BAMHI-A: o ebv-miR-BART7, que vem corroborar a hipótese que os miRNA podem ser usados como biomarcadores de rastreio. De facto, este miRNA está também associado a vias oncogénicas e portanto poderia ser usado como marcador de rastreio do carcinoma nasofaríngeo, especialmente em casos em que o DNA do vírus não consegue ser detetado [41].

CONCLUSÃO

O Epstein-Barr é um vírus pertencente à família dos herpesvírus e a sua presença foi já implicada na fisiopatologia de inúmeras neoplasias, nomeadamente do carcinoma nasofaríngeo. A forma como o vírus infeta o hospedeiro permitiu descrever duas fases do seu ciclo (latente e lítica), ambas importantes para a carcinogénese e para a perpetuação da infeção. Efetivamente, os vários genes e proteínas latentes estão particularmente implicados em mecanismos de oncogénese através da sua associação com diversas vias, mecanismos anti-apoptóticos e proliferativos...

A compreensão da fisiopatologia do vírus no carcinoma nasofaríngeo revelou assim ser uma fase decisiva para o desenvolvimento de marcadores que pudessem identificar o carcinoma nasofaríngeo precocemente, idealmente antes de se tornar sintomático. Foi o que se conseguiu com recurso aos anticorpos anti-EBV e ao DNA de vírus. E apesar dos resultados dos diferentes estudos serem encorajadores no sentido do rastreio, não deixaram de apontar algumas limitações a estes marcadores relacionados em parte com a sua especificidade no caso dos anticorpos.

Desta forma, as ideias mais recentes, ou pelo menos a sua maioria, para tentar colmatar algumas lacunas neste aspeto, relacionam-se abordagens não diretamente dependentes do EBV, como é o caso da quimiocina CCL27 ou os autoanticorpos contra antigénios tumorais. No entanto, é curioso verificar que a sensibilidade e a especificidade melhoravam quando associados a VCA-IgA, um dos anticorpos anti-EBV, pelo que o vírus também acaba por desempenhar um papel adjuvante, especialmente importante na aplicação destes métodos. Uma outra perspetiva recente consiste na utilização de miRNAs, especialmente muito úteis na deteção precoce de carcinoma, sendo uma alternativa importante quando o DNA do vírus não se encontra em níveis detetáveis.

Assim, desde a descoberta do vírus e do seu envolvimento na fisiopatologia do carcinoma nasofaríngeo evoluiu-se muito no sentido de o identificar precocemente. Apesar dos avanços, luta-se ainda para encontrar marcadores ou combinações destes para poder detetar o mais precocemente o carcinoma. Refira-se que alguns estudos também se têm focado mais nos métodos usados, também eles importantes na qualidade dos resultados obtidos, sendo estes um alvo importante nos estudos recentes.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Prof. Doutor Óscar Dias pelo apoio que me deu ao longo da elaboração do presente trabalho, nomeadamente pelas fontes bibliográficas que me recomendou e facultou. Agradeço ainda a forma recetiva com que acolheu a minha intenção de realizar a tese em Otorrinolaringologia.

Ao Doutor Marco Alveirinho Simão, pela disponibilidade que mostrou e por receber e esclarecer as minhas dúvidas.

Aos meus pais que sempre me apoiaram nas minhas escolhas, por me ajudarem nos meus momentos mais difíceis académicos e pessoais. Ao meu irmão, por ser o meu melhor amigo e inspiração em todos os níveis.

Aos meus amigos, que não cessam de me surpreender e que me desafiam constantemente a ser melhor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] van Hasselt CA. *Nasopharyngeal carcinoma*. 2nd ed. Hong Kong: The Chinese university press; 1999.
- [2] Thompson L.D. *Update on nasopharyngeal carcinoma*. Head Neck Pathol. 2007; 1:81–86.
- [3] Young L. S., and Dawson C. W.. 2014. *Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma*. Chin. J. Cancer 33:581–590.
- [4] Raab-Traub, N. *Epstein–Barr virus in the pathogenesis of NPC*. Semin. Cancer Biol. 12, 431–441 (2002).
- [5] Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2013). *Medical microbiology*. Philadelphia: Elsevier/Saunders.
- [6] Abbott RJ, Pachnio A, Pedroza-Pacheco I, Leese AM, Begum J, Long HM, et al. *Asymptomatic primary infection with Epstein-Barr virus: observations on young adult cases*. J Virol (2017) 91(21):e00382-17.10.1128/JVI.00382-17.
- [7] Niedobitek G, Murray PG, Young LS. *Epstein–Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma*. Mol. Pathol. 2000;53:248–254.
- [8] Thorley-Lawson DA, Hawkins JB, Tracy SI, Shapiro M. *The Pathogenesis of Epstein-Barr Virus Persistent Infection*. Current opinion in virology. 2013;3(3):227-232.
- [9] Hatton OL, Arnold-Harris A, Schaffert S, Krams SM, Martinez OM. *The Interplay Between Epstein Barr Virus and B Lymphocytes: Implications for Infection, Immunity, and Disease*. Immunologic research. 2014;58(0):268-276.
- [10] Kang M-S, Kieff E. *Epstein–Barr virus latent genes*. Experimental & Molecular Medicine. 2015;47(1):e131-.
- [11] Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH. *Progress and Problems in Understanding and Managing Primary Epstein-Barr Virus Infections*. Clinical Microbiology Reviews. 2011;24(1):193-209.

- [12] Li H, Liu S, Hu J, et al. *Epstein-Barr virus lytic reactivation regulation and its pathogenic role in carcinogenesis*. International Journal of Biological Sciences. 2016;12(11):1309-1318.
- [13] Chan KCA, Hung ECW, Woo JKS, Chan PKS, Leung SF, Lai FPT, et al. *Early detection of nasopharyngeal carcinoma by plasma Epstein-Barr virus DNA analysis in a surveillance program*. Cancer. 2013;119:1838–44.
- [14] *Nasopharyngeal Cancer: Multidisciplinary Management*. Edited by: Lu J, Cooper JS, Lee AWM. 2010, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- [15] Pak MW, Vlantis AC, Chow S, van Hasselt CA. *How reliable is contact endoscopy of the nasopharynx in patients with nasopharyngeal cancer?* The Laryngoscope 2009; 119:523–7.
- [16] Li YQ, Khin NS, Chua MLK. *The evolution of Epstein-Barr virus detection in nasopharyngeal carcinoma*. Cancer Biology & Medicine. 2018;15(1):1-5.
- [17] Li Y, Wang K, Yin SK, Zheng HL, Min DL. *Expression of Epstein-Barr virus antibodies EA-IgG, Rta-IgG, and VCA-IgA in nasopharyngeal carcinoma and their use in a combined diagnostic assay*. Genet Mol Res. 2016;15.
- [18] Henle G, Henle W. *Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma*. Int J Cancer. 1976;17:1–7.
- [19] Paramita DK, Fatmawati C, Juwana H, van Schaijk FG, Fachiroh J, et al. *Humoral immune responses to Epstein-Barr virus encoded tumor associated proteins and their putative extracellular domains in nasopharyngeal carcinoma patients and regional controls*. J Med Virol. 2011;83:665–678.
- [20] Ji MF, Wang DK, Yu YL, Guo YQ, Liang JS, et al. (2007) *Sustained elevation of Epstein-Barr virus antibody levels preceding clinical onset of nasopharyngeal carcinoma*. Br J Cancer 96: 623-630.
- [21] Cao SM, Liu ZW, Jia WH, Huang QH, Liu Q, Guo X, et al. *Fluctuations of Epstein-Barr virus serological antibodies and risk for nasopharyngeal carcinoma: a prospective screening study with a 20-year follow-up*. PLoS One. 2011;6:e19100.

- [22] Chien YC, Chen JY, Liu MY, Yang HI, Hsu MM, Chen CJ, et al. *Serologic markers of Epstein–Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in taiwanese men*. N Engl J Med. 2001;345:1877–82.
- [23] Tsang RK, Vlantis AC, Ho RW, Tam JS, To KF, van Hasselt CA. *Sensitivity and specificity of Epstein–Barr virus IGA titer in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma: a three-year institutional review*. Head Neck. 2004;26:598–602.
- [24] Chen Y, Xin X, Cui Z, Zheng Y, Guo J, Lin Y, Su G. *Diagnostic value of serum Epstein-Barr virus capsid antigen-IgA for nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis based on 21 studies*. Clin Lab. 2016;62(6):1155–1166.
- [25] Xia C, Zhu K, Zheng G. *Expression of EBV antibody EA-IgA, Rta-IgG and VCA-IgA and SA in serum and the implication of combined assay in nasopharyngeal carcinoma diagnosis*. International Journal of Clinical and Experimental Pathology. 2015;8(12):16104-16110.
- [26] Liu Y, Huang Q, Liu W, Liu Q, Jia W, Chang E, Chen F, Liu Z, Guo X, Mo H, et al. *Establishment of VCA and EBNA1 IgA-based combination by enzyme-linked immunosorbent assay as preferred screening method for nasopharyngeal carcinoma: a two-stage design with a preliminar performance study and a mass screening in Southern China*. Int J Cancer. 2012; 131 (2):406-16.
- [27] Wu L, Li C, Pan L. *Nasopharyngeal carcinoma: A review of current updates*. Experimental and Therapeutic Medicine. 2018;15(4):3687-3692.
- [28] Li YQ, Khin NS, Chua MLK. *The evolution of Epstein-Barr virus detection in nasopharyngeal carcinoma*. Cancer Biology & Medicine. 2018;15(1):1-5.
- [29] Chan KCA. *Plasma Epstein-Barr virus DNA as a biomarker for nasopharyngeal carcinoma*. Chinese Journal of Cancer. 2014;33(12):598-603.
- [30] Li HP, Hsu CL, Chang YS. *Screening of nasopharyngeal carcinoma using plasma Epstein-Barr virus DNA for at-risk population*. Ann Nasopharynx Cancer 2018;2:3.
- [31] Song C, Yang S. *A meta-analysis on the EBV DNA and VCA-IgA in diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma*. Pakistan Journal of Medical Sciences. 2013;29(3):885-890.

- [32] Shao JY, Li YH, Gao HY, QL W, Cui NJ, Zhang L, Cheng G, LF H, Ernberg I, Zeng YX. *Comparison of plasma Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels and serum EBV immunoglobulin a/virus capsid antigen antibody titers in patients with nasopharyngeal carcinoma*. *CANCER-AM CANCER SOC*. 2004;100(6):1162–70.
- [33] Chan KCA, Hung ECW, Woo JKS, Chan PKS, Leung SF, Lai FPT, et al. *Early detection of nasopharyngeal carcinoma by plasma Epstein-Barr virus DNA analysis in a surveillance program*. *Cancer*. 2013;119:1838–44.
- [34] Leung SF, Tam JS, Chan ATC, Zee B, Chan LYS, Huang DP, et al. *Improved accuracy of detection of nasopharyngeal carcinoma by combined application of circulating Epstein-Barr virus DNA and anti-Epstein-Barr viral capsid antigen IgA antibody*. *Clin Chem*. 2004;50:339–45.
- [35] Houali K, Wang X, Shimizu Y, et al. *A new diagnostic marker for secreted Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and BARF1 oncoproteins in the serum and saliva of patients with naso-pharyngeal carcinoma*. *Clin Cancer Res*. 2007;13:4493–5000.
- [36] Mao M, Xue N, Wang X, et al. *Chemokine CCL27 is a novel plasma biomarker for identification the nasopharyngeal carcinoma patients from the Epstein-Barr virus capsid antigen-specific IgA seropositive population*. *BMC Cancer*. 2018;18:9.
- [37] Peng Y. H., Xu Y. W., Huang L. S., et al. *Autoantibody signatures combined with Epstein-Barr virus capsid antigen-IgA as a biomarker panel for the detection of nasopharyngeal carcinoma*. *Cancer Prevention Research*. 2015;8(8):729–736.
- [38] Peng Y. H., Xu Y. W., Qiu S. Q., et al. *Combination of autoantibodies against NY-ESO-1 and viral capsid antigen immunoglobulin A for improved detection of nasopharyngeal carcinoma*. *Oncology Letters*. 2014;8(3):1096-1102.
- [39] Lin L-H, Xu Y-W, Huang L-S, et al. *Serum proteomic-based analysis identifying autoantibodies against PRDX2 and PRDX3 as potential diagnostic biomarkers in nasopharyngeal carcinoma*. *Clinical Proteomics*. 2017;14:6.
- [40] Wong AM, Kong KL, Tsang JW, et al. *Profiling of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs in nasopharyngeal carcinoma reveals potential biomarkers and oncomirs*. *Cancer*. 2012;118:698–710.

[41] Chan JY, Gao W, Ho WK, et al. *Overexpression of Epstein-Barr virus-encoded microRNA-BART7 in undifferentiated naso-pharyngeal carcinoma*. Anticancer Res. 2012;32:3201–3210.